

Method and device for the qualitative and/or quantitative determination of a ligand in a fluid

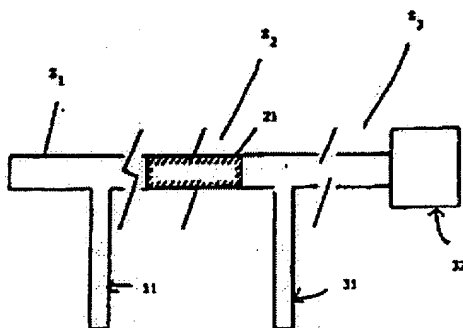
Patent number: FR2634891
Publication date: 1990-02-02
Inventor: UZAN MICHEL; GICQUEL THIERRY
Applicant: BIOTROL SA LAB (FR)
Classification:
 - international: G01N33/53; G01N33/538
 - european: G01N33/543K4
Application number: FR19880010359 19880801
Priority number(s): FR19880010359 19880801

Abstract of FR2634891

The present invention relates to a method and to a device for the qualitative and/or quantitative determination of a ligand present in a fluid, the determination being very simple to carry out and, where appropriate, easy to automate.

The device according to the invention comprises, in combination:

- means for bringing the test fluid sample F and the reactants A, B and C into contact;
- a first reaction zone Z1, arranged to receive a test fluid sample F and at least one liquid or solid labelled reactant A capable of recognizing at least one ligand L of interest possibly contained in the abovementioned sample, to form a soluble L-A complex;
- a second reaction zone Z2, separate from the first, comprising a solid phase 21 containing an antigen and/or an antibody and/or a complement of DNA and/or a complement of RNA capable of reacting only with the labelled reactant(s) A not bound to the ligand L, to form, where appropriate an insoluble A-B complex;
- a third reaction zone Z3, which contains a third reactant C for visualising the presence of the L-A complex, and, where appropriate
- means 32 for reading the reaction visualised in the zone Z3;
- means for automation of the sequential operation of the aforementioned means for bringing into contact and reading means.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑪ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : 2 634 891

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : 88 10359

⑬ Int Cl⁸ : G 01 N 33/53, 33/538.

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 1^{er} août 1988.

⑬ Priorité :

⑭ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPi « Brevets » n° 5 du 2 février 1990.

⑮ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑰ Demandeur(s) : Société dite : LABORATOIRES BIO-
TROL — FR.

⑱ Inventeur(s) : Michel Uzan ; Thierry Gicquel.

⑲ Titulaire(s) :

⑳ Mandataire(s) : Cabinet Orès.

⑳ Procédé et dispositif pour la détermination qualitative et/ou quantitative d'un ligand dans un fluide.

⑳ La présente invention est relative à un procédé et à un
dispositif pour la détermination qualitative et/ou quantitative
très simple à mettre en œuvre et éventuellement facilement
automatisable d'un ligand présent dans un fluide.

Le dispositif selon l'invention comprend en combinaison :

— des moyens de mise en contact de l'échantillon de fluide
F à tester et des réactifs A, B et C;

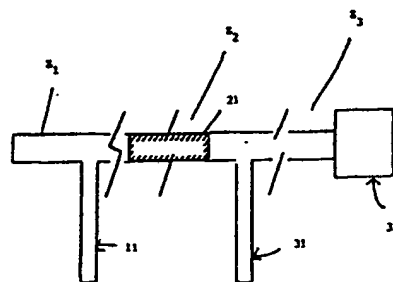
— une première zone de réaction Z₁ prévue pour recevoir
un échantillon de fluide F à tester et au moins un réactif A
marqué, liquide ou solide, apte à reconnaître au moins un
ligand L recherché, éventuellement contenu dans ledit échantil-
lon, pour former un complexe L-A soluble;

— une deuxième zone de réaction Z₂ distincte de la pre-
mière, comprenant une phase solide 21 contenant un antigène
et/ou un anticorps et/ou un complément d'ADN et/ou un
complément d'ARN apte à ne réagir qu'avec le(s) réactif(s) A
marqué(s) non liés au ligand L, pour former, éventuellement
un complexe A-B insoluble;

— une troisième zone de réaction Z₃ qui contient un troi-
sième réactif C de révélation de la présence du complexe L-A
et, éventuellement;

— des moyens de lecture 32 de la réaction révélée dans la
zone Z₃;

— des moyens d'automatisation de la commande séquen-
cielle desdits moyens de mise en contact et des moyens de
lecture.



FR 2 634 891 - A1

D

1
La présente invention est relative à un procédé et à un dispositif pour la détermination qualitative et/ou quantitative très simple à mettre en oeuvre et éventuellement facilement automatisable d'un ligand présent dans un fluide. L'invention s'applique plus particulièrement, mais non limitativement, à la détection de la présence d'anticorps, d'antigènes ou d'haptènes dans un fluide biologique, et notamment au dosage de substances (telles qu'hormones, vitamines, enzymes, médicaments, etc..).

10 Les méthodes de détermination de la présence ou de la concentration de substances antigéniques dans des fluides biologiques, par voie immunologique, sont à présent bien connues ; elles sont basées sur la formation d'un complexe entre la substance antigénique à déterminer et un ou des anticorps, l'un des composants du complexe pouvant être
15 marqué par une enzyme (telle que peroxydase du raifort, phosphatase alcaline ou β -galactosidase, par exemple) ou un élément radioactif (tel que ^{125}I , par exemple) pour permettre sa détection et/ou son analyse quantitative après
20 séparation de l'antigène ou de l'anticorps marqué complexé, de l'antigène ou de l'anticorps marqué non complexé.

Plusieurs modalités techniques sont utilisées.

Dans les méthodes de détermination indirectes pour le dosage des anticorps par exemple, l'antigène est
25 fixé sur un support approprié. L'échantillon à doser est ajouté et la fixation des anticorps est détectée par l'addition d'anticorps anti-Ig couplés à l'enzyme et révélés quantitativement au spectrophotomètre après addition du substrat de l'enzyme. La quantité d'anticorps marqué associée au complexe est proportionnelle à la quantité de substance antigénique contenue dans l'échantillon.

Dans les méthodes de détermination par compétition, la substance antigénique contenue dans l'échantillon de liquide à analyser entre en compétition avec une quantité connue d'antigène marqué par une enzyme pour une quantité limitée de sites de fixation de l'anticorps : la quan-

2

tité d'antigène marqué liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène contenue dans l'échantillon.

Des tests immunométriques particulièrement adaptés à la détection d'antigènes polyvalents, c'est-à-dire de substances antigéniques capables de se complexer avec au moins deux anticorps en même temps, consistent à utiliser une quantité d'anticorps non marqué lié à un support solide insoluble dans le liquide à analyser, et une quantité d'anticorps soluble couplé à une enzyme, qui permet la détection ou la détermination quantitative du complexe ternaire formé entre l'anticorps en phase solide, l'antigène et l'anticorps marqué. Ces méthodes sont connues sous le nom de méthodes "sandwich" ou "bi-site", du fait que l'antigène porte deux anticorps liés à sa surface en deux sites différents.

Ces méthodes consistent à mettre tout d'abord en contact l'anticorps lié à la phase solide avec l'échantillon à analyser, pour extraire l'antigène de l'échantillon, par formation d'un complexe binaire entre l'anticorps en phase solide et l'antigène.

Le complexe est ensuite mis en contact avec une solution contenant une quantité connue d'anticorps marqué, l'ensemble devant être lavé, puis la présence d'anticorps marqué sur le support solide lavé est détectée.

De nombreux brevets décrivent différentes applications de ces techniques (Brevet américain n° 4 174 384, Brevet américain n° 4 098 876, Brevet français n° 81 15030, Brevet n° 82 16973, par exemple).

Ces différentes méthodes présentent néanmoins un certain nombre d'inconvénients dans le cadre de dosages en série à grande échelle :

- elles présentent des difficultés d'automatisation notamment liées au fait que le complexe à révéler est fixé à une phase solide ; ou bien

- elles sont limitées à certains types de molécules uniquement (notamment haptènes ou protéines, par exemple) ; ou bien
- elles nécessitent un étalonnage fastidieux à réaliser et de ce fait mal adapté à l'échelle industrielle ; ou bien
- elles présentent tous ces inconvénients à la fois.

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un procédé et à un dispositif pour la détermination qualitative et quantitative, aisée à mettre en oeuvre, de la présence d'un ligand, dans un fluide, qui répondent mieux aux nécessités de la pratique que les procédés et dispositifs visant au même but proposés dans l'Art antérieur, notamment en ce que le procédé conforme à l'invention permet de détecter et/ou de déterminer n'importe quelle substance antigénique quelque soit la taille de celle-ci, c'est-à-dire, y compris les haptènes, et les substances diverses telles que médicaments ainsi que les anticorps ; en ce qu'il permet également de réaliser lesdits dosages en série de par la simplicité du dispositif mis en oeuvre et en ce que le résultat est aisément interprétable et n'entraîne pas la réalisation d'un étalonnage fastidieux, en particulier pour les haptènes, la réponse étant linéaire.

La présente invention a pour objet un procédé de détermination qualitative et/ou quantitative de la présence d'au moins un ligand L dans un fluide, caractérisé en ce qu'on met en contact, au cours d'une première étape, un échantillon de fluide F à analyser, avec au moins un premier réactif A marqué, liquide ou solide, choisi de manière à ce que le complexe L-A formé au cours de cette étape soit soluble dans le fluide F à analyser, en ce qu'au cours d'une deuxième étape, ledit échantillon dans lequel est éventuellement formé un ou plusieurs complexe(s) binaire(s) L-A, est mis en contact avec un deuxième réactif B comprenant un antigène et/ou un anticorps et/ou un complément ADN et/ou un complément ARN fixé(s) sur un support solide

approprié, apte à réagir avec le(s) réactif(s) A non lié(s) au ligand L, lors du passage dudit échantillon à travers ledit réactif B pour obtenir un complexe A-B insoluble, et en ce qu'au cours d'une troisième étape, on met ledit échantillon en contact avec au moins un troisième réactif C, liquide ou solide, de révélation de la présence -ou de l'absence- du/des réactif(s) A dans ledit échantillon F, la présence dudit (desdits) réactif(s) A étant directement proportionnelle à la concentration du ligand L que l'on cherche à détecter.

Le procédé permet, donc, contrairement aux procédés de l'Art antérieur, de ne jamais fixer le ligand sur une phase solide et permet de cette manière un dosage simple et précis en phase liquide homogène.

Conformément à l'invention, le réactif A est marqué de manière appropriée, notamment par une enzyme, par un radioisotope, par un produit chimique chromophore fluorescent ou chimioluminescent.

Ledit réactif A comprend avantageusement un anticorps polyclonal ou monoclonal et/ou un antigène et/ou un haptène et/ou une sonde d'ADN et/ou une sonde d'ARN, seul ou en association avec un support solide.

Le ligand est avantageusement un anticorps, toute substance antigénique, notamment une substance chimique, telle qu'un médicament, un micro-organisme, notamment un virus ou tout autre micro-organisme après traitement approprié pour obtenir des antigènes figurés, un fragment d'ADN ou un fragment d'ARN.

Conformément à l'invention, lorsque le ligand à détecter est un fragment d'ADN ou d'ARN, l'échantillon à tester est, préalablement à la détection, traité de manière appropriée.

Conformément à l'invention, le support du réactif B, et dans le cas où le réactif A et/ou le réactif C comportent un support solide, ce dernier est constitué

d'une membrane et/ou d'une colonne d'affinité et/ou d'un tube approprié.

Ledit support peut être en matériaux divers tels que fibre de verre, polyamide, papier, gel de silice, agarose, polymères, tels que sépharose, séphadex, polyvinyl, polystyrène, polypropylène, alginates.

Lorsque la phase solide du réactif B est une colonne d'affinité, celle-ci contient préférentiellement un gel de silice.

Le réactif B est, alors, un gel de silice activé par un antigène, un haptène, un anticorps, un complément ADN ou un complément ARN apte à réagir avec le réactif A.

L'anticorps, l'antigène ou l'haptène fixé sur le support solide du réactif B est avantageusement identique au ligand recherché.

Un tel réactif B permet d'éliminer le réactif A marqué, au cas où celui-ci est sous forme libre.

Selon une disposition avantageuse du procédé conforme à l'invention, le réactif B comprend un anticorps monoclonal choisi dans le groupe qui comprend des anticorps spécifiques anti-réactif A, des anticorps anti-idiotype appropriés, des fragments anti-Fab appropriés.

Conformément à l'invention, on régénère éventuellement les réactifs A et/ou B et/ou C par un réactif approprié entre deux séries de dosages ou un nombre déterminé de dosages.

La présente invention a également pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend en combinaison :

- des moyens de mise en contact de l'échantillon de fluide F à tester et des réactifs A, B et C ;
- une première zone de réaction Z₁ prévue pour recevoir un échantillon de fluide F à tester et au moins un réactif A marqué, liquide ou solide, apte à reconnaître au moins un

ligand L recherché, éventuellement contenu dans ledit échantillon, pour former un complexe L-A soluble ;

- une deuxième zone de réaction Z₂ distincte de la première, comprenant une phase solide contenant un antigène et/ou un anticorps et/ou un complément ADN et/ou un complément ARN apte à ne réagir qu'avec le(s) réactif(s) A marqué(s) non lié(s) au ligand L, pour former, éventuellement un complexe A-B insoluble ;
- une troisième zone de réaction Z₃ qui contient au moins un troisième réactif C de révélation de la présence du complexe L-A et, éventuellement
- des moyens de lecture de la réaction révélée dans la zone Z₃ ;
- des moyens d'automatisation de la commande séquentielle desdits moyens de mise en contact et des moyens de lecture.

La mise en contact peut s'opérer soit par des moyens de capillarité, gravité ou encore par des moyens de circulation tels que pompes, centrifugeuses.

- Selon encore un autre mode de réalisation du dispositif conforme à l'invention, la zone Z₁ comprend, en outre, des moyens d'introduction du/des réactif(s) A marqué(s) et/ou du/des échantillon(s) à tester.

On prévoit également dans la zone Z₃ des moyens d'introduction du/des réactifs C.

- En variante, les trois zones Z₁, Z₂ et Z₃ comprennent une phase solide appropriée, conforme à l'invention.

- Selon une disposition de cette variante du dispositif conforme à l'invention, les trois zones de réaction sont des membranes appropriées.

Selon une modalité de cette disposition, lesdites membranes sont avantageusement choisies dans le groupe qui comprend les membranes en fibre de verre, les membranes en polyamide, les membranes cellulosiques.

- Le procédé conforme à l'invention a l'avantage d'être un procédé en phase homogène car la circulation

d'une même phase liquide, représentée par l'échantillon à analyser, est effectuée à travers différentes zones. Dans un tel procédé, le ligand à doser n'est jamais fixé sur une quelconque phase solide.

5 Ces deux caractéristiques dudit procédé permettent d'éviter les lavages et permettent, également, si on le désire, une automatisation simple à mettre en oeuvre.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention et à une description détaillée du dispositif avec référence au dessin annexé dans lequel :

15 - la Figure 1 représente une vue schématique illustrant un mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention ;

- la Figure 2 représente une vue schématique, en coupe, illustrant un mode de réalisation de l'installation.

20 Il doit être bien entendu, toutefois que ce dessin et les parties descriptives correspondantes, ainsi que les exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

25 Le procédé selon l'invention, de détermination qualitative et quantitative de la présence d'au moins un ligand dans un fluide est illustré sur la Figure 1.

30 Un échantillon de fluide F, par exemple, mais non limitativement du sérum, est introduit dans la zone Z₁, dans laquelle est également introduit le/les réactif(s) A par l'intermédiaire des moyens d'introduction 11. Lorsque l'invention prévoit le dosage de plusieurs ligands différents dans un même échantillon, le/les réactif(s) A est/sont introduit(s) séquentiellement.

Si le ligand à détecter est présent dans l'échantillon, un complexe binaire L-A se forme au niveau de la zone Z₁.

Les moyens de mise en contact, non représentés, sont, dans ce mode de mise en oeuvre, une pompe assurant le passage des échantillons et des réactifs en flux continu.

L'échantillon, contenant éventuellement les complexes L-A solubles dans l'échantillon traverse ensuite la zone Z₂, comprenant le réactif B, qui comporte dans la réalisation représentée comme support solide, une colonne d'affinité 21 en gel de silice, activé par un anticorps ou un antigène ou une sonde d'ADN ou une sonde d'ARN apte à réagir avec le réactif A non lié au ligand ; le passage à travers la zone Z₂ permet d'éliminer le réactif A sous forme libre.

Après le passage de l'échantillon dans la zone Z₂, ce dernier traverse la zone Z₃ qui comprend des moyens d'introduction 31 d'au moins un réactif C spécifique du/des marqueur(s) du/des réactif(s) A et des moyens de détection 32 de l'apparition d'une coloration, d'une fluorescence, d'une luminescence ou d'une radioactivité. La présence du réactif A, détectée dans la zone Z₃ est directement proportionnelle à la concentration du ligand que l'on cherche à détecter.

Dans la réalisation représentée, les moyens 32 sont un spectrophotomètre ; la lecture de la réaction colorée a lieu à 405 nm.

Dans les différentes zones Z₁, Z₂, Z₃, le temps de mise en contact est réglé en fonction du temps de d'incubation nécessaire à l'éventuelle formation desdits complexes binaires L-A dans la zone Z₁, à l'éventuelle formation d'un complexe A-B dans la zone Z₂ et à l'éventuelle révélation du complexe L-A dans la zone Z₃, par l'intermédiaire des moyens d'automatisation.

Dans ce mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, l'échantillon à analyser est intro-

duit en flux, le réactif A étant, lui, introduit séquentiellement par les moyens d'introduction 11 ; en ce cas, le dispositif est adapté à n'importe quel type de dosage.

En variante, le réactif A est introduit en flux
5 dans la zone Z_1 et c'est le/les échantillon(s) à analyser qui est/sont introduit(s) séquentiellement par l'intermédiaire des moyens d'introduction 11. En ce cas, le dispositif est spécifique au réactif A choisi.

La Figure 2 représente une vue schématique en
10 coupe, illustrant un autre mode de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

Dans ce mode de mise en oeuvre du procédé, l'échantillon à analyser est introduit par gravité ou par capillarité dans la zone Z_1 qui se présente sous la forme
15 d'une membrane, le réactif A étant alors sous forme lyophilisée et non lié à ladite membrane.

Si le ligand L à détecter est présent dans l'échantillon, un complexe binaire L-A soluble dans l'échantillon se forme au niveau de la zone Z_1 .

20 La circulation d'une zone à une autre est réalisée, dans ce mode de mise en oeuvre, par capillarité.

L'échantillon contenant éventuellement les complexes L-A traverse ensuite la zone Z_2 comprenant un réactif B, qui comporte dans la réalisation représentée une
25 membrane dans laquelle est lié un anticorps ou un antigène ou un complément ADN ou un complément ARN apte à réagir avec le réactif A non lié au ligand L, et formant, alors un complexe A-B. Le passage à travers la zone Z_2 permet d'éliminer le réactif A, présent sous forme libre.

30 Après le passage de l'échantillon dans la zone Z_2 , ce dernier traverse la zone Z_3 , qui est constituée d'une troisième membrane appropriée sur laquelle est dispersé le réactif C de révélation.

Dans ce mode de mise en oeuvre la lecture de la
35 révélation est uniquement visuelle.

10

La présence du réactif A est détectée dans la zone Z₃ uniquement qualitativement et est liée à la présence du ligand L que l'on cherche à détecter.

EXEMPLE 1 : -DOSAGE DE L'HCG (HORMONE POLYPEPTIDIQUE) :

5 Description des réactifs :

. Réactif A :

On utilise un fragment F(ab)' d'anticorps monoclonal de souris, spécifique de la chaîne β de l'hCG, marqué à la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La dilution d'utilisation est préparée à partir d'une solution 10 mère à 1 mg/ml, diluée dans une matrice protéique d'origine animale.

. Réactif B :

On utilise une colonne remplie de 0,2 cm³ de 15 gel de silice activé à la glutaraldéhyde, sur laquelle de l'hCG est liée par liaison covalente à une concentration de 3 000 UI/g de silice.

. Réactif C :

Le réactif C de révélation utilisé est le 20 paranitrophényl phosphate, hydrolysé en paranitrophénol sous l'action de la phosphatase alcaline couplée au fragment F(ab)' d'anticorps monoclonaux de souris, spécifique de la chaîne β de l'hCG (réactif A). La concentration de la solution utilisée est de 6 g/l.

25 Méthodologie :

Le sérum à tester est incubé avec le réactif A anti-hCG marqué à la phosphatase alcaline ; l'hCG présente dans le sérum se complexe avec ledit réactif A qui est présent en excès.

30 Ce mélange est passé dans la colonne contenant le gel de silice activé par de l'hCG qui capte le réactif A n'ayant pas réagi avec l'hCG présente dans le sérum.

L'activité enzymatique de l'éluat est mesurée grâce au réactif C de révélation ; elle est proportionnelle 35 à la quantité d'hCG présente dans l'échantillon.

EXEMPLE 2 : DOSAGE DE LA T4 TOTALE (HORMONE HAPTENIQUE) :**Description des réactifs :****. Réactif A marqué :**

On utilise un fragment F(ab)' d'anticorps monoclonal de souris, spécifique de la T4, marqué à la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La dilution d'utilisation est préparée à partir d'une solution mère à 1 mg/ml, diluée dans une matrice protéique d'origine animale. Dans cette dilution se trouve également de l'ANS (acide amino-8 naphthalène sulfonique) à la concentration de 400 mg/l, servant à libérer la T4 des protéines porteuses.

. Réactif B :

On utilise une colonne remplie de 0,2 cm³ de gel de silice activé à la glutaraldéhyde, sur laquelle la T4 est couplée sous forme d'un complexe T4-BSA, à la concentration suivante : 100 mg d'équivalent protéine du complexe T4-BSA pour 1g de silice.

. Réactif C :

Le réactif C utilisé est le paranitrophényl phosphate hydrolysé en paranitrophénol sous l'action de la phosphatase alcaline couplée au fragment F(ab)' d'anticorps monoclonal de souris, spécifique de la T4 (réactif A). La concentration de la solution utilisée est de 6 g/l.

Méthodologie :

Le sérum à tester est incubé avec le réactif A marqué anti T4 contenant de l'ANS.

L'ANS libère la T4 de ses protéines et celle-ci se fixe sur le réactif A marqué (qui est présent en excès) pour donner un complexe binaire L-A.

Ce mélange est passé dans la colonne et le conjugué en excès n'ayant pas réagi est capté par les molécules de T4 fixées sur le gel.

Le complexe T4-anti-T4-phosphatase alcaline (PAL) est présent dans l'éluat et peut être dosé grâce au réactif C. Le signal obtenu est proportionnel à la concentration de T4 de l'échantillon.

EXEMPLE 3 : SEROLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE (DOSAGE D'ANTI-CORPS) :

Description des réactifs :

. Réactif A :

5 Il s'agit d'un complexe antigène toxoplasme-F(ab)' d'anticorps polyclonal de lapin antitoxoplasme marqué à la phosphatase alcaline d'intestin de veau. Les proportions utilisées sont de 5 µg d'antigène pour 1 µg d'anticorps marqué.

10 **. Réactif B :**

On utilise une colonne remplie de 0,2 cm³ de gel de silice activé à la glutaraldéhyde, sur laquelle on fixe par liaison covalente de l'anticorps polyclonal de lapin antitoxoplasme, à la concentration de 100 mg d'anti-
15 corps/g de silice.

. Réactif C :

Le réactif C utilisé est le paranitrophenyl phosphate, hydrolysé en paranitrophénol sous l'action de la phosphatase alcaline couplée au complexe (réactif A). La
20 concentration de la solution utilisée est de 6 g/l.

Méthodologie :

Le sérum est incubé avec le réactif A (complexe antigène toxoplasme-anticorps polyclonal de lapin marqué à la PAL, en excès dans ce mélange).

25 Ce mélange est ensuite passé dans la colonne de gel de silice activé par un anticorps de lapin antitoxoplasme, celui-ci capte l'antigène toxoplasmique marqué n'ayant pas réagi.

30 Le complexe anticorps (du sérum) antitoxoplasmique/antigène marqué par le conjugué antitoxoplasme de lapin-PAL se trouve dans l'éluat et peut être dosé grâce au réactif C.

35 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre et d'application qui viennent d'être décrits de façon explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les

2634891

13

variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1') Procédé de détermination qualitative et/ou quantitative de la présence d'au moins un ligand L dans un fluide, caractérisé en ce qu'on met en contact, au cours d'une première étape, un échantillon de fluide F à analyser, avec au moins un premier réactif A marqué, liquide ou solide, choisi de manière à ce que le complexe L-A formé au cours de cette première étape soit soluble dans le fluide F à analyser, en ce qu'au cours d'une deuxième étape, ledit échantillon dans lequel est éventuellement formé un ou plusieurs complexe(s) binaire(s) L-A, est mis en contact avec un deuxième réactif B comprenant un antigène et/ou un anticorps et/ou un complément d'ADN et/ou un complément d'ARN fixé(s) sur un support solide approprié, apte à réagir avec le(s) réactif(s) A non lié(s) au ligand L, lors du passage dudit échantillon à travers ledit réactif B pour obtenir un complexe A-B insoluble et en ce qu'au cours d'une troisième étape, on met ledit échantillon F en contact avec au moins un troisième réactif C, liquide ou solide, de révélation de la présence -ou de l'absence- du/des réactif(s) A dans ledit échantillon, la présence dudit (desdits) réactif(s) A étant directement proportionnelle à la concentration du ligand L que l'on cherche à détecter.

2') Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif A est marqué de manière appropriée (par une enzyme, par un radioisotope, par un produit chimique chromophore fluorescent ou chimioluminescent).

3') Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le réactif A comprend avantageusement un anticorps polyclonal ou monoclonal et/ou un antigène et/ou un haptène et/ou une sonde d'ADN et/ou une sonde d'ARN, seul ou en association avec un support solide.

4') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le support du réactif B et, dans le cas où le réactif A et/ou le réactif C com-

15

portent un support solide, ce dernier est constitué d'une membrane et/ou d'une colonne d'affinité et/ou d'un tube approprié.

5 5') Procédé selon la revendication 4, caracté-
risé en ce que lorsque la phase solide du réactif B est une
colonne d'affinité, celle-ci contient préférentiellement un
gel de silice.

10 6') Procédé selon la revendication 1, caracté-
risé en ce que l'anticorps, l'antigène ou l'haptène fixé
sur le support solide du réactif B est avantageusement
identique au ligand recherché.

15 7') Procédé selon l'une quelconque des revendi-
cations 1 et 6, caractérisé en ce que le réactif B comprend
un anticorps monoclonal choisi dans le groupe qui comprend
des anticorps spécifiques anti-réactif A, des anticorps
anti-idiotype appropriés, des fragments anti-Fab appro-
priés.

20 8') Procédé selon l'une quelconque des reven-
dications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on régénère éventuel-
lement les réactifs A et/ou B et/ou C par un réactif appro-
prié entre deux séries de dosages ou un nombre déterminé de
dosages.

25 9') Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que lorsque le ligand à détecter est un
fragment d'ADN ou un fragment d'ARN, l'échantillon à tester
est, préalablement à la détection, traité de manière
appropriée.

30 10') Dispositif pour la mise en oeuvre du pro-
cédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,
caractérisé en ce qu'il comprend en combinaison :

- des moyens de mise en contact de l'échantillon de fluide F à tester et des réactifs A, B et C ;
 - une première zone de réaction (Z₁) prévue pour recevoir un échantillon de fluide F à tester et au moins un réactif
- 35 A marqué, liquide ou solide, apte à reconnaître au moins un

ligand L recherché, éventuellement contenu dans ledit échantillon, pour former un complexe L-A soluble ;

- une deuxième zone de réaction (Z₂) distincte de la première, comprenant une phase solide (21) contenant un antigène et/ou un anticorps et/ou un complément d'ADN et/ou un complément d'ARN apte à ne réagir qu'avec le(s) réactif(s) A marqué(s) non lié(s) au ligand L, pour former, éventuellement un complexe A-B insoluble;
- une troisième zone de réaction (Z₃) qui contient un troisième réactif C de révélation de la présence du complexe L-A et, éventuellement
- des moyens de lecture (32) de la réaction révélée dans la zone Z₃ ;
- des moyens d'automatisation de la commande séquentielle desdits moyens de mise en contact et des moyens de lecture.

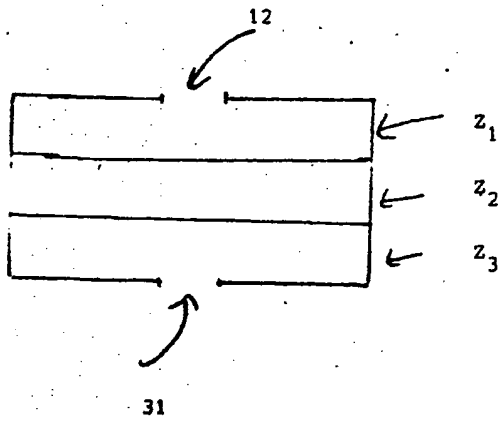
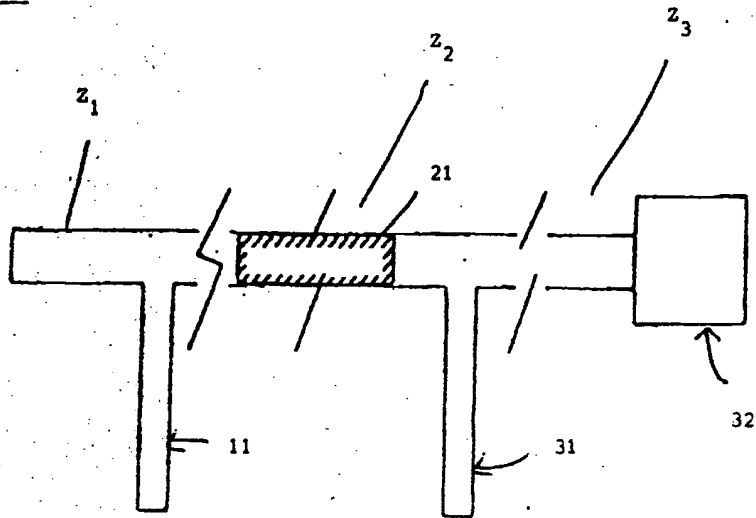
11') Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce que la zone (Z₁) comprend, en outre, des moyens d'introduction (11) du/des réactif(s) A marqué(s) et/ou du/des échantillon(s) à tester.

12') Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on prévoit également dans la zone (Z₃) des moyens d'introduction (31) du réactif C.

13') Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce que les trois zones (Z₁), (Z₂) et (Z₃) comprennent une phase solide appropriée, selon la revendication 4.

14') Dispositif selon la revendication 13, caractérisé en ce que les trois zones de réaction sont des membranes appropriées.

15') Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que lesdites membranes sont avantageusement choisies dans le groupe qui comprend les membranes en fibre de verre, les membranes en polyamide, les membranes cellulosiques.

FIGURE 1FIGURE 2